Bestimmung von Glycerin, Glycerinaldehyd, Glycerat–3–phosphat, Glycerin–Dehydrogenase, Glycerokinase und Glycerin–3–phosphat–Dehydrogenase in Inkubationslösungen von Kaninchen–Hirnschnitten.

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

vorgelegt von

Joachim Waehlert

Saarbrücken

1973

Aus der Neurochirurgischen Klinik der Universität
des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. med. F. Loew

Bestimmung von Glycerin, Glycerinaldehyd, Glycerat-3-phosphat, Glycerin-Dehydrogenase, Glycerokinase und Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase in Inkubationslösungen von Kaninchen-Hirnschnitten.

I N A U G U R A L D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde
der
HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

1973

vorgelegt von

Joachim Waehlert
geb. am 31.10.1944 in Bad Homburg

Dekan: Prof. Dr. med. Jutzler
Referent: Prof. Dr. med. F. Loew

Mündliche Prüfung abgelegt am 14. Dezember 1973

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547310_0051

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1. Einleitung 3
2. Material und Methoden 10
2.1 Präparation der Hirnschnitte 10
2.2 In vitro-Inkubationen 11
2.3 Grundlage des optischen Tests 13
2.4 Ergebnisermittlung 15
3. Bestimmungen 20
3.1 Glycerin-Bestimmung 21
3.2 Glycerinaldehyd-Bestimmung und -Ergebnis 23
3.2.1 Lactat-Dehydrogenase-Bestimmung und -Ergebnis 35
3.2.2 Malat-Dehydrogenase-Bestimmung und -Ergebnis 37
3.3 Glycerat-3-phosphat-Bestimmung 39
3.4 Glycerin-Dehydrogenase-Bestimmung 41
3.5 Glycerokinase-Bestimmung 42
3.6 Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase-Bestimmung 43
4. Ergebnisse 44
4.1 Glycerin-Ergebnis 44
4.2 Glycerat-3-phosphat-Ergebnis 45
4.3 Glycerin-Dehydrogenase-Ergebnis 52
4.4 Glycerokinase-Ergebnis 53
4.5 Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase-Ergebnis 55
5. Diskussion 56
6. Zusammenfassung 67
7. Schrifttumsverzeichnis 68
8. Abkürzungsverzeichnis 73

Lebenslauf

1. EINLEITUNG

Im Labor der Neurochirurgischen Klinik in Homburg läuft ein Programm von Experimenten über den Stoffwechsel von Kaninchengehirnen. Die Versuche bestehen aus manometrischen Messungen des Glukose-Stoffwechsels von Schnitten aus normalem und ödematösem (kältegeschädigten) Gehirn. Die manometrischen Messungen werden durch enzymatische Bestimmungen von Glukose, Lactat und Pyruvat kontrolliert (DITTMANN und HERRMANN (9); DITTMANN, HERRMANN und OBERMANN (10); HERRMANN und DITTMANN (13)).
Während der in vitro-Inkubationen werden zu einem Teil der Reaktionsgefäße Substanzen gegeben. Auf diese Weise wird untersucht, ob Stoffwechsel und Wassergehalt der Schnitte beeinflußt werden können. Diese Frage interessiert aus zwei Gründen: erstens ist die Beziehung zwischen Veränderung des Wassergehaltes der Schnitte und Veränderung ihres Glukose-Stoffwechsels biochemisch interessant. Zweitens kann man hoffen, daß die Substanzen, die die stets auftretende Wassereinlagerung in die Schnitte bei Inkubationen verringern, auch in vivo gegenüber Hirnödemen wirksam sind und den Zellen Wasser entziehen.

Bei der Durchführung der angedeuteten Versuche fiel auf, daß die Salzlösungen nach den Inkubationen Protein enthielten. Deshalb wurde in einem kleineren Versuchsprogramm untersucht, ob in den Lösungen auch bestimmte Enzymaktivitäten vorhanden sind.
Zu einem Teil der skizzierten Fragen sollen die Experimente der vorliegenden Arbeit Klärung bringen.

Die erste Substanz, die in höherer Konzentration den Wassergehalt der Hirnschnitte erniedrigt, ist das Glycerin. SLOVITER, SHIMKIN und SUHARA (22) stellten die Frage, ob Glycerin als Substrat für den Hirnstoffwechsel dienen kann. In vitro wiesen sie Bildung von CO_2 aus Glycerin durch Meerschweinchen-Hirnschnitte nach. Die Oxydation des Glycerins ist wesentlich langsamer als die Oxydation von Glukose; sie steigt aber fast linear mit der Glycerinkonzentration, und in Gegenwart von 25 mM Glycerin wird etwa die selbe Atmungsgeschwindigkeit erreicht wie in Gegenwart von 2 mM Glukose. In vivo wiesen die Autoren einseitige EEG-Verbesserungen bei hypoglykämischen Kaninchen nach einseitiger Infusion von Glycerin in die Carotis interna nach.

TOURTELLOTTE, REINGLASS und NEWKIRK (24) empfehlen häufige orale oder kontinuierliche intravenöse Glyceringaben zur Behandlung von Hirnödemen und zur Erniedrigung des Augeninnendruckes. Sie wiesen in ihrer Arbeit nach, daß Glycerin kaum in das Gehirn eindringt. Deshalb besteht keine Gefahr einer späteren Wassereinlagerung in das Gehirn durch rebound effect. Andererseits wird dadurch auch eine ernährende Wirkung von Glycerin auf das Gehirn ausgeschlossen.

TROBISCH (26) konnte bei Säuglingen durch orale Glyceringaben eine zuverlässige Senkung des Liquordruckes bewirken.

Im Rahmen dieser Arbeit soll geprüft werden, ob Glycerin verstoffwechselt wird.

Versuche mit Glycerinaldehyd wurden aus verschiedenen Gründen durchgeführt: Im Interesse einer chemischen Systematik ist es interessant, den Aldehyd, der auf mittlerer Oxydationsstufe zwischen dem Alkohol Glycerin und der Säure 3-Phosphoglycerinsäure steht, mit zu untersuchen. Vom biochemischen Standpunkt ist der Glycerinaldehyd gerade in den letzten Jahren wieder interessant geworden, weil WARBURG, GAWEHN, GEISSLER und LORENZ (30) unter Berücksichtigung älterer Beobachtungen von MENDEL (18) die glykolysehemmende Wirkung des Glycerinaldehyds zur Behandlung von Tumoren einsetzen wollten. Diese Versuche hatten wegen des raschen Abbaues von Glycerinaldehyd im Organismus keinen Erfolg (von ARDENNE und TÜMMLER (2); von ARDENNE und REITNAUER (1)); bei Zugabe von Glycerinaldehyd zu Hirnschnitten zeigten sich aber interessante Ergebnisse: Die Glykolyse der Hirnschnitte wurde bereits durch 5 mM Glycerinaldehyd stark gehemmt. Die Schwellung der Schnitte in vitro wurde dadurch wesentlich erhöht (SEIFERT, in Vorbereitung (21)).

Innerhalb meiner Arbeit soll untersucht werden, ob auch die Kaninchen-Hirnschnitte Glycerinaldehyd durch Stoffwechsel abbauen.

Bei Versuchen zur Messung der ADP-Bildung aus ATP in Gegenwart zellfreier Überstände aus manometrischen Experimenten wurden in den Proben mit Glycerinaldehydzusatz keine (LITSCH (17)) oder nur sehr geringe (GEBICKE (11)) Enzymaktivitäten gefunden. Es erhob sich die Frage, ob der Glycerinaldehyd wegen seiner Reaktionsfreudigkeit unspezifisch durch Denaturierung von Proteinen

alle Enzymaktivitäten hemmte, oder ob spezifisch die Freisetzung von ATP-spaltendem Enzym gehemmt wurde. Zur Klärung dieser Frage sollen im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwei Enzyme bestimmt werden, die sonst in Inkubationslösungen von Kaninchen-Hirnschnitten in hoher Aktivität vorliegen. Dies sind Lactat-Dehydrogenase und Malat-Dehydrogenase.

Eine zweite Substanz, welche den Wassergehalt der Hirnschnitte herabsetzt, ist 3-Phosphoglycerinsäure. Von dieser Substanz genügen bereits Konzentrationen von 5 - 10 mM, um selbst in isotonen Lösungen den Wassergehalt der Hirnschnitte signifikant zu verringern (DITTMANN, in Vorbereitung (8)). Ursprünglich wurde die Wirksamkeit von Glycerat-3-phosphat aus verschiedenen Gründen getestet: In anderen Versuchen war eine entwässernde und stoffwechselsteigernde Wirkung von Zuckerphosphaten nachgewiesen worden (Glukose- und Fruktose-1- und -6-phosphat, Fruktose-1.6-diphosphat). Es lag nun nahe, auch andere in der Glykolysekette unter dem Fruktosediphosphat stehende Intermediärprodukte hinsichtlich ihrer Fähigkeit zu untersuchen, Glykolyse oder Atmung der Schnitte zu steigern und dadurch ihre Schwellung zu verringern.

Eine andere vielleicht für unser Testsystem wichtige Wirkung des 3-Phosphoglycerats ist die Phosphorylierung von Nucleosid-Diphosphaten zu den entsprechenden Triphosphaten. Eine hohe Konzentration von Glycerat-3-phosphat kann über längere Zeit zu einer ständigen Regenerierung von ATP führen, wenn 3-Phosphoglycerat-Mutase,

Enolase und Pyruvat-Kinase in ausreichenden Aktivitäten vorhanden sind.

BATES, CRADDOCK und SIMPSON (3) machten Versuche über den Einbau von Aminosäuren, wie Valin, in das Cytochrom c innerhalb von Mitochondrien. Dieser Vorgang läuft unter Anwesenheit von ATP ab, das entweder durch oxydative Phosphorylierung oder aus Kreatinphosphat gebildet wird. Der Ersatz von Kreatinphosphat durch Glycerat-3-phosphat gab ähnliche Resultate. In diesem Fall wirkt Glycerat-3-phosphat über die 3-Phosphoglycerat-Mutase-, Enolase- und Pyruvatkinase-Reaktionen als eine ATP-erzeugende Substanz.

LAGERKVIST (16) setzte einem Reaktionsgemisch zur Synthese von Guanosinphosphat aus Inosinphosphat ebenfalls Glycerat-3-phosphat als ATP-regenerierende Substanz zu.

Schließlich machten NEUBERG, SALVESEN und OSTER (19) die Beobachtung, daß bestimmte Salze des Glycerat-3-phosphats normalerweise schwerlösliche Substanzen in Wasser löslich machen. Zum Beispiel zeigt das Natrium-Salz der 3-Phosphoglycerinsäure gute Löslichkeitseigenschaften für das wasserunlösliche Calciumcarbonat.

Für meine Arbeit ergibt sich die Fragestellung, ob Glycerat-3-phosphat bei den in vitro-Inkubationen von Kaninchen-Hirnschnitten in größerem Umfang abgebaut wird.

Im Rahmen anderer Dissertationen waren bereits Aktivitäten einiger Enzyme in den Lösungen nachgewiesen worden, in denen manometrische Versuche mit Kaninchen-Hirnschnitten durchgeführt worden waren (TRAUTMANN (25);

SCHÖNBERGER (20), GEBICKE (11) und THYSON (23)). Die Frage eines extrazellulären Glycerinabbaues wäre besser zu beantworten, wenn man weiß, ob Enzyme, die Glycerin als Substrat benötigen, nach den Versuchen in den Lösungen nachweisbar sind. Zwei wichtige Enzyme aus dieser Gruppe sind die Glycerin-Dehydrogenase und die Glycerokinase. Ihr Vorkommen in den beschriebenen Salzlösungen aus Warburg-Versuchen mit Hirnschnitten soll in dieser Arbeit ebenfalls nachgeprüft werden.

In vorangegangenen Untersuchungen wurde nachgewiesen (KLINGE (15)), daß Fruktosediphosphat, das den Stoffwechsel steigert und die Schwellung der Schnitte verringert, in beträchtlichem Umfang extrazellulär durch Aldolase in die beiden Triose-Phosphate aufgespalten wird. Nicht geklärt ist bisher die Frage, ob Dihydroxyacetonphosphat weiter in Glycerin-3-phosphat umgewandelt werden kann. Deshalb will ich in meiner Arbeit untersuchen, ob Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase in den Inkubationslösungen nach den Warburg-Versuchen nachweisbar ist. Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase-Messungen sind auch deshalb interessant, weil nach einer Untersuchung von DE VELLIS und ENGLISH (27) Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase im Rattenhirn in spezifischer Weise durch Cortisol kontrolliert wird. (In den gleichen Versuchen zeigten Malat-, Isocitrat- und Lactat-Dehydrogenase keine Cortisolabhängigkeit).

In Zusammenfassung vorstehender Einleitung sollen noch einmal die Fragen genannt werden, die in meiner Arbeit zu untersuchen sind:

Findet ein Abbau von Glycerin in Gegenwart von Kaninchen-Hirnschnitten statt?

Wird Glycerinaldehyd durch die Hirnschnitte verstoffwechselt?

Sind nach Zusatz von Glycerinaldehyd zu Kaninchen-Hirnschnitten Lactat-Dehydrogenase und Malat-Dehydrogenase in den Lösungsproben in den gleichen Aktivitäten nachweisbar wie in den Kontrollen ohne Zusatz von Glycerinaldehyd?

Bauen die Hirnschnitte Glycerat-3-phosphat ab?

Sind in den Salzlösungen, in denen vorher einige Stunden lang Kaninchen-Hirnschnitte im Warburg-Versuch geschüttelt worden waren, Glycerin-Dehydrogenase, Glycerokinase und Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase nachweisbar?

2. MATERIAL und METHODEN

2.1. Präparation der Hirschnitte

Rasselose Kaninchen von 2-3 Kilogramm Gewicht wurden durch Einspritzen von Luft in eine Ohrvene getötet. Nach Eröffnen des Schädels und Spaltung der Dura wurde das Gehirn mit einem Löffel herausgenommen und sofort in eisgekühlte Salzlösung gegeben. Die Salzlösung wird abgekürzt "K-Lösung" genannt und hat folgende Zusammensetzung:

NaCl	106,0 mM
KCl	4,7 mM
$CaCl_2$	2,5 mM
$MgSO_4$	0,8 mM
Na_2HPO_4	1,2 mM
KH_2PO_4	0,3 mM
$NaHCO_3$	25,0 mM
Glukose	5,0 mM

Nach Abpräparieren der Arachnoidea wird von beiden Hemisphären parietal ein Streifen Hirnrinde von 300-500 mg Frischgewicht herausgeschnitten. Nach Abpräparieren der Weißen Substanz werden in einer gekühlten Petrischale mit einem Skalpell Prismen von ca. 0,5-1,0 mm Seitenlänge und maximal 0,3 mm Dicke geschnitten. Die Schnitte werden mehrmals mit kalter K-Lösung gewaschen, anschließend mittels eines Faltenfilters abgetrennt und zum Schluß mit einer Pinzette möglichst gleichmäßig in vorbereitete Reaktionsgefäße verteilt.

2.2. In vitro-Inkubationen

Der Stoffwechsel wird nach der Zwei-Gefäß-Methode von WARBURG (28) unter definierten N_2-O_2-CO_2-Mischungen bei 38°C in K-Lösung gemessen.

Das Prinzip der Methode besteht darin, daß in den beiden Gefäßen eines Gefäßpaares der gleiche Stoffwechsel abläuft, d.h. pro mg Hirntrockensubstanz die gleiche Menge O_2 verbraucht wird (Atmung) und die gleiche Menge CO_2 entsteht (Atmung, Glykolyse in bicarbonathaltiger Lösung). Im Gefäß I mißt man die Differenz aus Druckzunahme (CO_2-Bildung) und Druckabnahme (O_2-Verbrauch), die stets positiv ist. In den großen Anhänger des Gefäßes II gibt man einen definierten $KHCO_3$-K_2CO_3-Puffer mit 2 mg Carboanhydrase. Dieser Puffer hat so große Kapazität, daß er den CO_2-Partialdruck im Reaktionsgefäß auf beliebig wählbarer Höhe konstant hält und bei Stoffwechselvorgängen gebildetes CO_2 bindet. In diesem Gefäß II mißt man deshalb direkt die durch den O_2-Verbrauch verursachte Druckabnahme. Mit zwei Gleichungen kann man aus den Gefäßkonstanten und den gemessenen Druckänderungen für jedes Gefäßpaar die CO_2-Bildung und die O_2-Aufnahme berechnen.

Bei den Versuchen wurden in den Anhänger stets 3,0 ml H_2O (Gefäß I) bzw. 2,9 ml $KHCO_3$-K_2CO_3-Puffer und 0,1 ml wässriger Lösung von Carboanhydrase (Gefäß II) gegeben. Der Hauptraum aller Gefäße enthielt 3,0 bzw. 2,7 ml K-Lösung mit Hirnschnitten. Die Birne der Gefäße war leer (Kontrolle) oder enthielt 0,3 ml der Lösung der

Stoffe, die untersucht werden sollen. Außerdem wurde zu jedem Versuch eine Standard-Lösung angesetzt, ein Gemisch aus K-Lösung und der zu bestimmenden Substanz in der höchsten molaren Konzentration. Dieser Standard wurde nicht mit den Hirnschnitten inkubiert.

Die Gehirne waren jeweils 3-5 min nach Tod der Tiere entfernt, bis zum Einhängen der Reaktionsgefäße in den Thermostaten vergingen weitere 90 min. Nach Begasen der Gefäße und Abwarten des Druckausgleiches (insgesamt 30 min) wurde der Stoffwechsel 160 min lang gemessen, wobei nach 30-minütiger Messung die Wirkstoffe aus der Birne in den Hauptraum gekippt wurden.

Nach den Messungen wurden die Suspensionen der Schnitte mit Glasröhrchen aus den Gefäßen entfernt und 10 min bei 3000 · g zentrifugiert. Die Schnitte werden zur Ermittlung der Trockensubstanz-Gewichte ca. 18 Stunden bei 105°C getrocknet, die bei der Zentrifugation erhaltenen klaren Lösungen waren bis zur Untersuchung bei -40°C eingefroren.

2.3 Grundlage des optischen Tests

Der von WARBURG (29) entwickelte "Optische Test" ist eine analytische Methode, die folgende Grundlage hat: Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid (NAD) hat im UV praktisch keine Lichtabsorption, während die reduzierte Form (NADH) bei 340 nm ein starkes und bei 365 nm ein zweites schwächeres Absorptionsmaximum hat. Durch Messung der Extinktionsänderung wässriger Lösungen kann man deshalb sehr einfach bestimmen, ob bei einer chemischen Reaktion NADH gebildet oder verbraucht wird. Da die molaren Extinktionskoeffizienten des NADH bei den einzelnen Wellenlängen bekannt sind, kann man mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes die umgesetzten NADH-Mengen berechnen.

Die allgemeine Formel zur Berechnung von NADH-Umsätzen ist:

$$c = \frac{\Delta E \cdot V \cdot d \cdot 10^6}{\varepsilon \cdot v} \qquad \left[\mu M/ml\right]$$

Hierbei bedeuten: c = Konzentration

ΔE = die gemessene Extinktionsänderung

V = Gesamtvolumen in der Küvette (ml)

v = Volumen der eingesetzten Probe (ml)

ε = der molare Extinktionskoeffizient

d = Schichtdicke der Küvette

(ε ist bei 334 nm $6 \cdot 10^6$ und bei 366 nm $3{,}3 \cdot 10^6$)

Der einfache optische Test ist nur bei Reaktionen anwendbar, bei denen NADH (bzw. NADPH) gebildet oder verbraucht werden. Andere Reaktionen, z.B. Phosphorylierungen,

Isomerisierungen oder ähnliches, können im zusammengesetzten optischen Test erfasst werden. Hierbei setzt man andere Substrate und Hilfsenzyme zu und koppelt die zu messende Reaktion an eine andere Reaktion, die NADH bildet oder verbraucht.
Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden mit einem Eppendorf-Photometer bei 334 nm durchgeführt. Diese Wellenlänge entspricht einer Emissionslinie des Hg-Dampf-Spektrums und liegt sehr nahe bei dem messtechnisch besonders günstigen Absorptionsmaximum des NADH bei 340 nm.

Man unterscheidet grundsätzlich Endwert-Bestimmungen (Substrate) und Aktivitäts-Bestimmungen (Enzyme).

Bei Endwert-Bestimmungen wird eine Substanz völlig umgesetzt, dadurch wird ihre Konzentration ermittelt. Die Reaktionstemperatur braucht hierbei nicht konstant gehalten zu werden. Den Extinktionsverlauf mit der Zeit habe ich vor und nach Start der Reaktion auf einem Schreiber registriert.
Bei Aktivitäts-Bestimmungen werden Reaktionsgeschwindigkeiten, d.h. Substanzumsätze pro Zeiteinheit, ermittelt. Wegen der starken Temperaturabhängigkeit von Reaktionsgeschwindigkeiten wurden diese Bestimmungen im Küvettenhalter durchgeführt, der auf 25°C temperiert wurde.

2.4 Ergebnisermittlung

2.4.1 Aktivitätsbestimmung eines Enzyms

Die für jede Bestimmung benötigten Lösungen (außer der Start-Lösung, die diejenige Substanz enthält, durch deren Zusatz eine photometrisch messbare Reaktion gestartet wird) werden in einer Küvette gut vermischt und in das Photometer eingebracht. Ist eine Extinktionsänderung schon vor dem Start vorhanden, so kann folgende Reaktion ablaufen: Die eventuell vorhandene Brenztraubensäure in der K-Lösung wird durch Umsetzung von NADH in NAD beseitigt. Dieser Reaktionsablauf wird in 3-minütigen Abständen notiert.

Ist der Reaktionsstillstand eingetreten, kann dem Gemisch die Start-Lösung zugegeben werden und die nun folgende Extinktionsänderung wird in 1-minütigen Abständen bis zur 6. Minute einschließlich notiert:

Notiz-Schema:

MDH-Best.; Versuch W 4; Küv.: 82; 5 mM; 20,3 mg Trs.

	min	Extinktion
	0′	0,140/12[+)]
	3′	0,142/12
	6′	0,144/12
	9′	0,144/12
Start	0′	0,109/12
	1′	0,105/12
	2′	0,100/12
	3′	0,095/12
	4′	0,090/12
	5′	0,085/12
	6′	0,080/12

+) diese Ziffer nach dem Schrägstrich gibt die Photometer-Grobeinstellung an

Der Substanzumsatz pro Zeiteinheit lässt sich nun aus der Extinktionsänderung von der 2. bis zur 6. Minute errechnen. In vorstehendem Beispiel beträgt die Extinktionsänderung ΔE: $E_{2min} - E_{6min} = \Delta E = 0{,}020/4$ min.

Zur Errechnung der Aktivität wird folgende Formel benutzt:

$$\frac{\Delta E \cdot V \cdot 1000 \cdot 3 \cdot d \cdot f}{\text{min} \cdot v \cdot 6 \cdot \text{mg Trs.}} = \frac{\text{mU}}{\text{mg Trs.}}$$

Hierbei bedeuten: $\Delta E/min$ = Extinktionsänderung pro min

V = Gesamtvolumen in der Küvette(ml)

d = Schichtdicke der Küvette

v = Volumen der K-Lösung (ml)

f = Verdünnungsfaktor

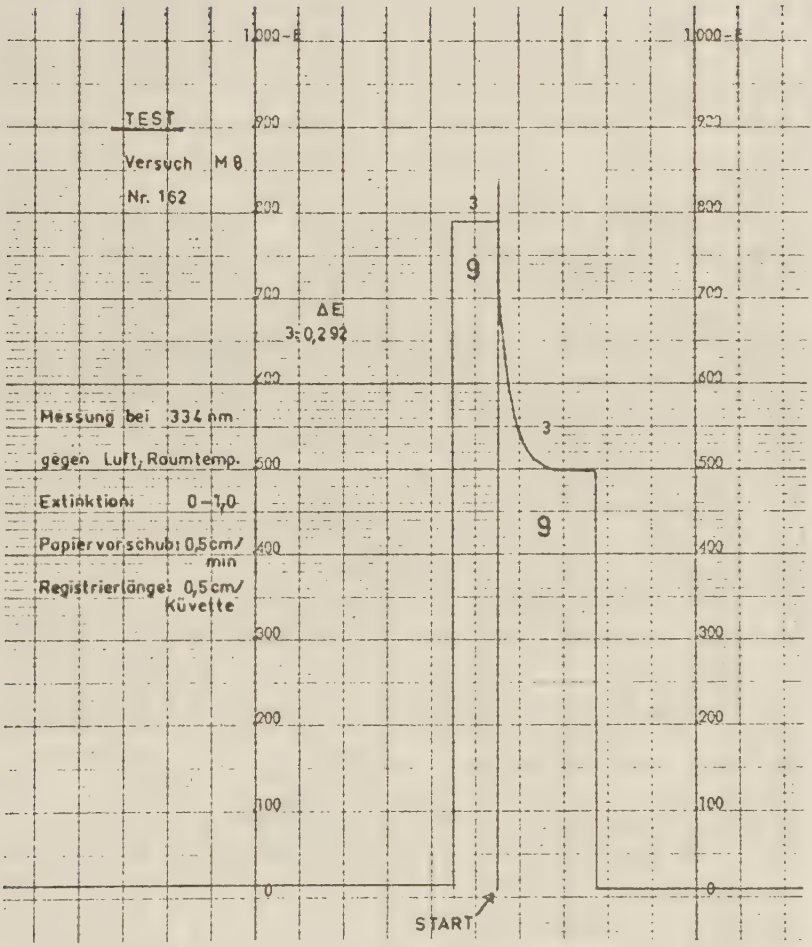
2.4.2 Substrat- oder Endwert-Bestimmung

Bei dieser Bestimmung wird der Reaktionsablauf so lange im Verhältnis mit der Zeit registriert, bis das Substrat völlig umgesetzt ist.

Hierzu habe ich einen Schreiber benutzt, der mit dem Photometer gekoppelt ist, und mit dem ich in der Lage war, gleichzeitig 6 verschiedene Proben in ihrem Reaktionsverlauf zu registrieren.

Die Vorbereitungen sind die gleichen wie bei den Aktivitätsbestimmungen.

Die folgende Kurve zeigt den Reaktionsablauf einer einzelnen Küvette.



Reaktionsablauf einer einzelnen Probe (Substrat-Bestimmung); registriert mit einem Photometer-Schreiber.

Der waagerechte Kurvenverlauf vor Start zeigt, daß in dem Küvettengemisch keine Reaktion abläuft, Extinktion E_1= 0,790; nach Zugabe der Start-Lösung lief diese Reaktion in ca. 20 min bis zu E_2= 0,498 aus.

Die Extinktionsänderung ΔE beträgt also: E_1-E_2 = 0,292.

Zwei Formeln wurden zur Ergebnisermittlung benutzt:

a) Molaritätsbestimmung

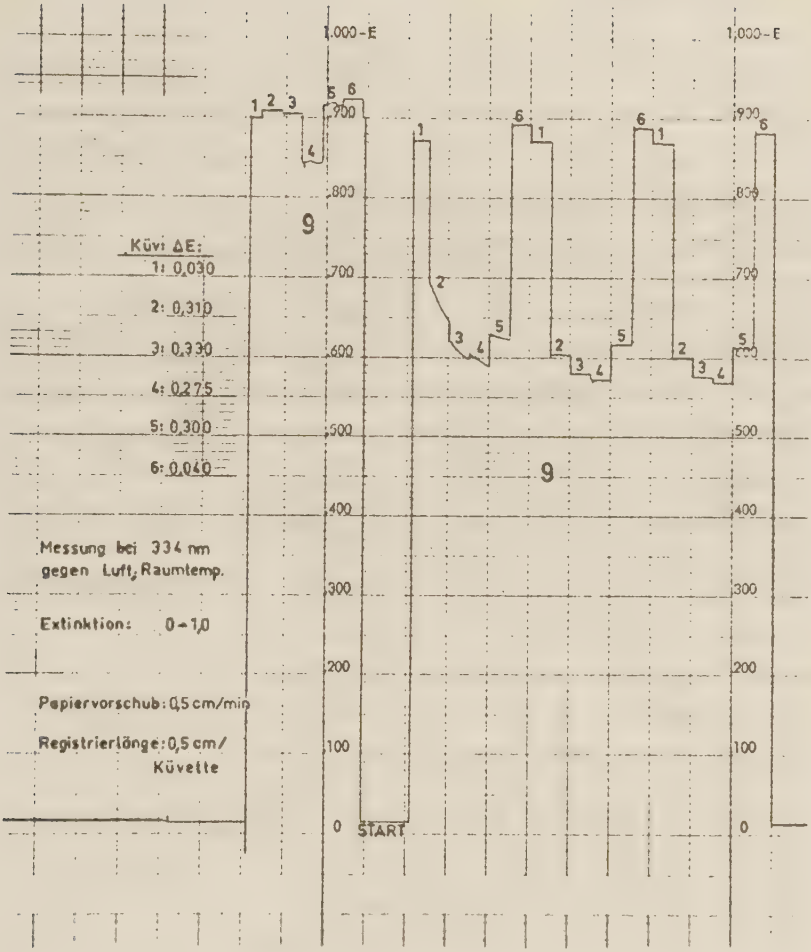
$$\frac{\Delta E \cdot V \cdot f \cdot d}{v \cdot 6} = mM = \mu \text{ Mol/ml}$$

Hierbei bedeuten: ΔE = Extinktionsänderung
V = Gesamtvolumen (ml) in der Küvette
f = Verdünnungsfaktor
d = Schichtdicke der Küvette
v = Volumen (ml) der eingesetzten K-Lösung

b) Bestimmung des Substratverbrauchs pro mg Trockensubstanz

$$\frac{(c_o - c_1) \cdot a \cdot MG}{\text{mg Trs.}} = \frac{\mu\text{g Substratverbrauch}}{\text{mg Trs.}}$$

Hierbei bedeuten : c_o = Konzentration in der Standardlösung (mM)
c_1 = Konzentration in der Probe (mM)
a = Probevolumen (ml) je Reaktionsgefäß der Stoffwechselmessung (= 3 ml)



Reaktionsablauf 6 verschiedener Proben (Küvetten 1 - 6) bei der Substrat-Bestimmung; registriert mit einem Photometer-Schreiber.

Die Ziffern über der Kurve geben die Küvettennummer, die Ziffern darunter die Photometer-Grobeinstellung an. Die Extinktionsänderungen der einzelnen Proben sind auf dem Kurvenblatt unter ΔE angegeben.

3. BESTIMMUNGEN

Die vorsichtig aufgetauten Proben wurden unmittelbar vor der Bestimmung 10 min bei 3000 • g zentrifugiert (Enzymbestimmungen) oder mit Perchlorsäure enteiweißt (Substratbestimmungen). Alle Messungen wurden in Glasküvetten durchgeführt. Für die Herstellung der Lösungen wurde in einer Glasapparatur destilliertes Wasser verwendet.
Über die Einzelheiten der technischen Durchführung informieren die nachstehenden Tabellen. Die dort verwendeten Abkürzungen werden in der Tabelle am Ende der Arbeit erläutert.
Alle Enteiweißungen bei den folgenden Substratbestimmungen wurden nach einem einheitlichen Schema vorgenommen:

x ml K-Lösung
+ y ml 0,165 M Perchlorsäure ($HClO_4$),
einige Stunden in Kälte (ca. + 4°C) stehen lassen,
10 min bei 3000 • g zentrifugieren,
+ z ml 1,1 M Kaliumphosphat-Lösung (K_2HPO_4), schwenken,
einige Stunden in Kälte stehen lassen,
10 min bei 3000 • g zentrifugieren,
Überstand abgießen (= enteiweißte Probe).

Nach Zugabe der Perchlorsäure mußten sich nach einigen Stunden unter Kälteeinwirkung Perchlorat-Kristalle bilden, die dann abzentrifugiert wurden.
Der für die Bestimmungen benötigte pH-Bereich der Proben wurde durch entsprechende Volumenänderungen von $HClO_4$ und K_2HPO_4 erreicht, die ich jeweils bei den einzelnen Bestimmungen angeben werde.

3.1. GLYCERIN-BESTIMMUNG

(nach BOEHRINGER (5))

Reaktionsgleichung:

$$\text{Glycerin} + \text{ATP} \xrightarrow{\text{GK}} \text{Glycerinphosphat} + \text{ADP}$$

$$\text{ADP} + \text{PEP} \xrightarrow{\text{PK}} \text{ATP} + \text{Pyruvat}$$

$$\text{Pyruvat} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Lactat} + \text{NAD}$$

Enteiweißung:

0,5 ml K-Lösung
\+ 2,0 ml 0,165 M $HClO_4$
\+ 1,5 ml 1,100 M K_2HPO_4

GLYCERIN-BESTIMMUNG

Test-Lösungen			Reaktionsmischung	
Substanzen	Konzentration mg/ml	Molarität mM	Ansatzmenge ml	End-Molarität mM
TRA-Puffer[1]		100	2,50	79,50
NADH; Na-Salz		6	0,10	0,19
ATP; Na-Salz		33		1,05
PEP		11		0,35
LDH	2		0,02	
PK	1			
K-Lösung			0,50	
GK[2]	2		0,02	

1) Triäthanolamin-Puffer mit 4 mM $MgSO_4$; pH = 7,6

2) Start mit Glycerokinase-Lösung nach Extinktionsstillstand (ca. 40 min) des Gemisches.

3.2 GLYCERINALDEHYD-BESTIMMUNG und -ERGEBNIS

Reaktionsgleichung:

$$\text{Glycerinaldehyd} + \text{NADH} \xrightarrow{\text{ADH}} \text{Glycerin} + \text{NAD}$$

Enteiweißung: (pH = 6,0)

1,0 ml K-Lösung
\+ 5,0 ml 0,165 M $HClO_4$
\+ 0,9 ml 1,100 M K_2HPO_4

Originalansatz: (nach GOEDDE und LANGENBECK (12))

Citrat-Puffer; 0,33 M; pH = 6,0	1,00 ml
NADH; Na-Salz; 15 mM	0,03 ml
H_2O	1,60 ml
K-Lösung	0,40 ml
ADH; 30 mg/ml	0,06 ml (Start)

Vor der Bestimmung des Glycerinaldehyds (GA) aus den zu untersuchenden K-Lösungen habe ich einige Versuchsmessungen durchgeführt, wobei ich auf erhebliche Schwierigkeiten gestoßen bin. Der Reaktionsablauf war meist zu langsam.

1. Versuch:

Küvettenansatz nach Originalansatz, nur wurde statt der K-Lösung eine wässrige Lösung von reinem GA genommen; die Reaktionsgeschwindigkeit war zu langsam.

2. Versuch:

Küvettenansatz nach Originalansatz mit wässriger GA-Lösung und zusätzlicher Mengenänderung des NADH: 0,05 ml statt 0,03 ml NADH; die Reaktionsgeschwindigkeit war gleichbleibend langsam.

3. Versuch:

Küvettenansatz nach Originalansatz mit reiner GA-Lösung und einer Mengenänderung von ADH: 0,07 ml statt 0,06 ml ADH; keine Zunahme der Reaktionsgeschwindigkeit.

4. Versuch:

Bestimmung der GA-Konzentration aus dem Versuch K 2 (s. nächste Seite).

Fraglich ist, ob man diese Ergebnisse auswerten kann, da erst nach ca. 12 Stunden ein Stillstand der Reaktionen eingetreten war. Dabei konnte man beobachten, daß in den Kontrollen schon zu einem früheren Zeitpunkt teilweise eine Trübung aufgetreten war. Beobachtete man die K-Lösungen selbst nach Stillstand der Reaktion, so trat in diesen Küvetten ebenfalls Trübung auf; unsicher ist also, ob die Ergebnisse echte Endwertbestimmungen sind.

GLYCERINALDEHYD-BESTIMMUNG

Versuch K 2

Test-Lösungen			Reaktionsmischung	
Substanzen	Konzentration mg/ml	Molarität mM	Ansatzmenge ml	End-Molarität mM
Citrat-Puffer[1)]	70	330	1,00	107,00
NADH; Na-Salz	10	12	0,03	0,12
H_2O			1,60	
K-Lösung			0,40	
ADH[2)]	30		0,06	

1) mit 20 %iger NaOH auf pH = 6,0 eingestellt

2) Start mit Alkohol-Dehydrogenase-Lösung nach Extinktionsstillstand des Gemisches

GLYCERINALDEHYD-ERGEBNIS

Versuch K 2

Proben Nr.	Molarität mM	1. Ergebnis mM	2. Ergebnis mM	Mittelwert in mM (± S; N = 2)
57	1[+)]	0,18	0,22	0,20 ± 0,02
54	1	0,14	0,40	0,27 ± 0,13
37	5	1,02	1,20	1,11 ± 0,09
24	5	0,88	1,02	0,95 ± 0,07

+) Anfangskonzentration

5. Versuch:

Bei den folgenden zwei Versuchen wurde die wässrige GA-Lösung nicht mit Perchlorsäure und Kaliumphosphat-Lösung (also nicht "enteiweißt") versetzt und es wurde eine Ansatzänderung vorgenommen:

Citrat-Puffer; 0,33 M; pH = 6,0	1,00 ml
NADH; Na-Salz; 12 mM	0,03 ml
H_2O	1,60 ml
GA-Lösung; 1 mM	0,40 ml
ADH; 30 mg/ml	0,06 ml (Start)

Die Reaktionsgeschwindigkeit betrug: $\Delta E/30$ min = 0,01; also immer noch zu langsam.

6. Versuch:

Ansatzänderung:

Citrat-Puffer; 0,33 M; pH = 6,0	1,00 ml
NADH; Na-Salz; 12 mM	0,04 ml
GA-Lösung; 1 mM	1,75 ml
ADH; 30 mg/ml	0,30 ml (Start)

Dieser Versuch zeigte ein gutes Ergebnis durch die hohe GA-Konzentration: $\Delta E/10$ min = 0,17; doch beim Ersetzen der GA-Lösung durch die K-Lösungen war die Reaktionsgeschwindigkeit bei dieser Versuchsanordnung wiederum zu langsam, da in den K-Lösungen ja kleinere GA-Konzentrationen vorhanden waren.

In der Annahme, daß in den älteren Proben der GA sich möglicherweise teilweise zersetzt haben könnte, wurde ein neuer Warburg-Versuch durchgeführt, damit ich mit ganz frischen K-Lösungen arbeiten konnte; sie wurden noch am gleichen Tag aufgearbeitet.

7. Versuch:

Aus diesem neuen Versuchsprogramm habe ich zunächst wieder einige Probeversuchsabläufe mit dem Standard (dem Perchlorsäure und Kaliumphosphat-Lösung zugesetzt wurde) vorgenommen. Doch auch hier war keine Verbesserung des Versuchsablaufs zu erkennen, selbst nach starker Erhöhung der ADH-Lösung nicht.

8. Versuch:

Hier habe ich mit nicht enteiweißten Proben und mit folgendem Ansatz gearbeitet:

Citrat-Puffer; 0,33 M; pH = 6,0	1,70 ml
NADH; Na-Salz; 12 mM	0,03 ml
H_2O	1,00 ml
K-Lösung	0,06 ml
ADH; 30 mg/ ml	0,30 ml (Start)

Reaktionsgeschwindigkeit zu langsam!

9. Versuch:

Wieder mit einer wässrigen GA-Lösung gearbeitet und folgende Ansatzänderung vorgenommen:

Citrat-Puffer; 0,33 M; pH = 6,0	1,00 ml
NADH; Na-Salz; 12 mM	0,04 ml
reiner GA[+)]	1,75 ml
ADH; 30 mg/ml	0,30 ml (Start)

+) einige mg GA wurden direkt in die Küvette gegeben. Durch die hohe GA-Konzentration lief diese Reaktion schnell genug ab; anscheinend ist das das Kriterium für einen annähernd schnellen Versuchsablauf bei dieser Versuchsanordnung.

10. Versuch:

Zur Annäherung an die GA-Konzentration in den Proben habe ich erneut eine Ansatzänderung vorgenommen:

Citrat-Puffer; 0,33 M; pH = 6,0	1,36 ml
NADH; Na-Salz; 12 mM	0,03 ml
H_2O	1,00 ml
GA-Lösung	0,40 ml
ADH; 30 mg/ml	0,30 ml (Start)

Der Versuchsablauf war wieder zu langsam; bei Aufwärmen der Küvettenmischung auf 35°C trat sofort Trübung auf!

11. Versuch:

Die K-Lösungen aus dem Warburg-Versuch W wurden folgendermaßen enteiweißt:

0,5 ml K-Lösung
+ 2,5 ml 0,165 M $HClO_4$
+ 0,45ml 1,100 M K_2HPO_4

Ansatz:

Citrat-Puffer; 0,33 M; pH = 6,0	1,36 ml
NADH; Na-Salz; 12 mM	0,03 ml
H_2O	1,00 ml
K-Lösung	0,40 ml
ADH; 30 mg/ml	0,30 ml (Start)

Die theoretische Überschlagsrechnung bei einer 5 mM GA-Anfangskonzentration des Standards sollte eine Extinktionsänderung von $\Delta E = 0,56$ ergeben.

Nach einer Stunde Reaktionszeit trat in allen Küvetten Trübung ein. Bis dahin betrug $\Delta E = 0,25$, das entspricht einer Standard-Molarität von 1,4 mM; der Versuch war also vor der Trübung noch nicht zu Ende abgelaufen!

GLYCERINALDEHYD-BESTIMMUNG

Versuch W 1

Test-Lösungen			Reaktionsmischung	
Substanzen	Konzentration mg/ml	Molarität mM	Ansatzmenge ml	End-Molarität mM
Citrat-Puffer[1]	70	330	1,65	176,00
NADH; Na-Salz	10	12	0,04	0,16
H_2O			1,00	
K-Lösung			0,10	
ADH[2]	30		0,30	

1) mit 20 %iger NaOH auf pH = 6,0 eingestellt

2) Start mit Alkohol-Dehydrogenase-Lösung nach Extinktionsstillstand des Gemisches

GLYCERINALDEHYD-ERGEBNIS

Versuch W 1

Proben Nr.	Molarität mM	1. Ergebnis mM	2. Ergebnis mM	3. Ergebnis mM	Mittelwert in mM (± S; N = 3)
Standard	10,84	12,44	9,20	--	10,84 ± 1,60
82	10,84	8,48	5,80	6,30	6,86 ± 0,84
65	10,84	7,57	2,16	5,40	5,04 ± 1,57
57	2,17	0,36	0,18	1,08	0,54 ± 0,35
46	2,17	0,00	0,00	0,72	0,72

12. Versuch:

Vorstehende Tabellen; Versuchsdauer ca. 2 Stunden.

13. Versuch:

Bei sämtlichen vorangegangenen Versuchen mußte fast eine Stunde abgewartet werden, bis der Extinktionsstillstand des Gemisches vor dem Start eingetreten war, obwohl nie große Extinktionsänderungen vorlagen. Um diese und die ADH-Reaktion selbst eventuell beschleunigen zu können, habe ich bei den beiden letzten Versuchen statt des Citrat-Puffers einen Triäthanolamin-Puffer genommen.

Ansatz:

TRA-Puffer; 0,2 M; pH = 7,4	1,65 ml
NADH; Na-Salz; 12 mM	0,04 ml
H_2O	1,00 ml
K-Lösung (Standard)	0,10 ml
ADH; 30 mg/ml	0,30 ml (Start)

Der Reaktionsstillstand vor Start ist zwar schneller eingetreten, doch die ADH-Reaktionsgeschwindigkeit hat nicht zugenommen: $\Delta E/10$ min = 0,02.

14. Versuch:

s. nachstehender Versuch W 2; Versuchsdauer 7 Stunden! Fraglich ist, ob nach dieser langen Reaktionszeit die Ergebnisse überhaupt verwertbar sind.

GLYCERINALDEHYD-BESTIMMUNG

Versuch W 2

Substanzen	Test-Lösungen: Konzentration mg/ml	Test-Lösungen: Molarität mM	Reaktionsmischung: Ansatzmenge ml	Reaktionsmischung: End-Molarität mM
TRA-Puffer[1]	37	200	1,65	107,00
NADH; Na-Salz	10	12	0,04	0,16
H_2O			1,00	
K-Lösung			0,10	
ADH[2]	30		0,30	

1) Triäthanolamin-Puffer; pH = 7,4

2) Start mit Alkohol-Dehydrogenase-Lösung nach Extinktionsstillstand des Gemisches

GLYCERINALDEHYD-ERGEBNIS

Versuch W 2

Proben Nr.	Molarität mM	1. Ergebnis mM	2. Ergebnis mM	Mittelwert in mM (± S; N = 2)	GA-Verbrauch/mg Trs. in µg
Standard	20,30	19,5	21,1	20,3 ± 0,8	
82	20,30	14,1	14,1	14,1 ± 0	82,5
65	20,30	13,7	13,9	13,8 ± 0,1	101,5
57	4,06	1,8	2,2	2,0 ± 0,2	31,4
46	4,06	0,0	0,0	0,0	0,0

3.2.1 LACTAT-DEHYDROGENASE-BESTIMMUNG

(nach BOEHRINGER; modifiziert durch DITTMANN (7))

Reaktionsgleichung:

Pyruvat + NADH $\xrightarrow{\text{LDH}}$ Lactat + NAD

Test-Lösungen		Reaktionsmischung	
Substanzen	Molarität mM	Ansatzmenge ml	End-Molarität mM
Phosphat-Puffer; pH: 7,5	50,00	2,95	46,83
Pyruvat; Na-Salz[1)]	1,03		0,96
NADH; Na-Salz	9,00	0,10	0,29
K-Lösung[2)]		0,10	

1) 9 mg Na-Pyruvat zu 110 ml des Original-Puffers mit Pyruvat

2) Start mit K-Lösung nach Extinktionsstillstand des Gemisches

LACTAT-DEHYDROGENASE-ERGEBNISSE

Versuch W 3

Proben Nr.	GA-Molarität mM	1. Ergebnis mU/mg Trs.	2. Ergebnis mU/mg Trs.	Mittelwert (± S; N = 2) in mU/mg Trs.
94	Kontrolle	97,2	104,4	100,8 ± 3,6
92	Kontrolle	95,9	99,9	97,9 ± 2,0
82	5	79,4	87,2	83,3 ± 3,9
65	5	86,5	88,8	87,7 ± 1,2
57	1	84,5	82,4	83,5 ± 1,1
46	1	102,1	110,1	106,1 ± 4,0

3.2.2

MALAT-DEHYDROGENASE-BESTIMMUNG

(nach BOEHRINGER (5))

Reaktionsgleichung:

Aspartat + α-Ketoglutarat $\xrightarrow{\text{GOT}}$ Oxalacetat + Glutamat

Oxalacetat + NADH $\xrightarrow{\text{MDH}}$ L-Malat + NAD

Test-Lösungen		Reaktionsmischung	
Substanzen	Molarität mM	Ansatzmenge ml	End-Molarität mM
Phosphat-Puffer; pH: 7,4	100	3,00	92,4
Aspartat	42		39,0
α-Ketoglutarat	65	0,05	1,0
NADH; Na-Salz	12	0,05	0,2
GOT; 0,1 mg/ml		0,05	
K-Lösung[1)]		0,10	

1) Start mit K-Lösung nach Extinktionsstillstand des Gemisches

MALAT-DEHYDROGENASE-ERGEBNIS

Versuch W 4

Proben Nr.	GA-Molarität mM	1. Ergebnis mU/mg Trs.	2. Ergebnis mU/mg Trs.	Mittelwert (±S; N = 2) in mU/mg Trs.
94	Kontrolle	251,0	226,0	238,5 ± 12,5
92	Kontrolle	268,0	258,0	263,0 ± 5,0
82	5	200,0	240,0	220,0 ± 20,0
65	5	187,8	223,0	205,4 ± 17,6
57	1	160,5	195,0	177,8 ± 17,3
46	1	284,0	244,0	264,0 ± 20,0

3.3 GLYCERAT-3-PHOSPHAT-BESTIMMUNG (G-3-P)

(modifiziert nach CZOK (6))

Reaktionsgleichung:

G-3-P + ATP $\xrightarrow{PGK}$ 1.3-Diphosphoglycerat (G-1.3-P_2) + ADP

G-1.3-P_2 + NADH $\xrightarrow{GAPDH}$ Glycerinaldehyd-3-P + P_i + NAD

Glycerinaldehyd-3-P $\xrightarrow{TIM}$ Dihydroxyacetonphosphat

Dihydroxyaceton-P + NADH $\xrightarrow{GDH}$ Glycerin-3-P + NAD

Bei dieser Bestimmung ist zu beachten, daß pro Mol G-3-P 2 Mol NADH oxydiert werden!

Enteiweißung:

0,5 ml K-Lösung
+ 2,0 ml 0,165 M $HClO_4$
+ 1,5 ml 1,100 M K_2HPO_4

G-3-P-BESTIMMUNG

Test-Lösungen			Reaktionsmischung	
Substanzen	Konzentration mg/ml	Molarität mM	Ansatzmenge ml	End-Molarität mM
TRA-Puffer; pH: 7,5	18,60	100,0	1,90	63,4
$MgSO_4$	0,33	1,3		0,8
NADH; Na-Salz	10,00	12,0	0,05	0,2
ATP; Na-Salz	18,53	30,0	0,80	8,0
GAPDH	10,00		0,05	
GDH	0,20		0,05	
TIM	1,00			
K-Lösung			0,10	
PGK[1)]	10,00		0,05	

1) 1.Ablesung des Gemisches: K-Lösung, Puffer, ATP und NADH
2.Ablesung nach Zugabe von GDH/TIM und GAPDH
3.Ablesung nach Start durch Zugabe der Phosphoglyceratkinase-Lösung nach Extinktionsstillstand des Gemisches

3.4 GLYCERIN-DEHYDROGENASE-BESTIMMUNG

(nach WORTHINGTON (31))

Reaktionsgleichung:

Glycerin + NAD ⟶ Dihydroxyaceton + NADH[1)]

Test-Lösungen			Reaktionsmischung	
Substanzen	Konzentration mg/ml	Molarität mM	Ansatzmenge ml	End-Molarität mM
HCO_3^- - Puffer[2)]	50,0	500	0,6	100,0
NAD; Na-Salz	7,6	10	0,1	0,3
Ammoniumsulfat		1000	0,1	33,3
H_2O			1,4	
K-Lösung			0,5	
Glycerin; 87 µL/ml[3)]		1000	0,3	100,0

1) Reaktionsablauf unter Zusatz von Glycerin-Dehydrogenase (in der K-Lösung)

2) durch Stehenlassen an der Luft teilweise Umwandlung des Bicarbonats in Carbonat-Bicarbonat

3) 1.Ablesung des Gemisches: K-, Ammoniumsulfat- und NAD-Lösung
2.Ablesung nach Zugabe von Puffer und H_2O
3.Ablesung nach Start durch Zugabe der Glycerin-Lösung nach Extinktionsstillstand

3.5. GLYCEROKINASE-BESTIMMUNG

(modifiziert nach BOEHRINGER (4))

Reaktionsgleichung:

Glycerin + ATP $\xrightarrow{GK}$ Glycerin-1-Phosphat + ADP

Glycerin-1-P + NAD $\xrightarrow{GDH}$ Dihydroxyacetonphosphat + NADH

	Test-Lösungen		Reaktionsmischung	
Substanzen	Konzentration mg/ml	Molarität mM	Ansatzmenge ml	End-Molarität mM
Puffer[1)]	27,5	243	2,25	182,0
NAD; Na-Salz	15,0	20	0,07	0,5
ATP; Na-Salz	50,0	81	0,05	1,4
GDH	10,0		0,03	
K-Lösung			0,50	
Glycerin; 8,7 µL/ml		100	0,10	3,3

1) Glycin/NaCl-Puffer mit 1 N NaOH auf pH = 9,8 eingestellt; zusätzlich in einem ml 649 mg Hydrazinsulfat und 0,48 mg $MgCl_2$

2) Start mit Glycerin-Lösung nach Extinktionsstillstand des Gemisches

3.6 GLYCERIN-3-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE-BESTIMMUNG

(modifiziert nach BOEHRINGER (4))

Reaktionsgleichung:

Dihydroxyacetonphosphat + NADH $\xrightarrow{\text{GDH}}$ Glycerin-3-phosphat + NAD

	Test-Lösungen		Reaktionsmischung	
Substanzen	Konzentration mg/ml	Molarität mM	Ansatzmenge ml	End-Molarität mM
TRA-Puffer[1)]	66,9	360,0	2,39	287,0
NADH; Na-Salz	10,0	12,0	0,05	0,2
K-Lösung			0,50	
DAP[2)]	8,0	18,3	0,06	0,4

1) mit 1 N NaOH auf pH = 7,6 eingestellt

2) Start mit Dihydroxyacetonphosphat-Lösung nach Extinktionsstillstand des Gemisches

4.1 GLYCERIN-ERGEBNIS

Proben Nr.		Molarität mM	Mittelwert der Ergebnisse mM
Versuch M 8			Mittelwert (∓ S; N = 3)
Standard		69,0	69,0 ± 14,3
193	G[1)]	69,0	67,5 ± 14,7
189	G	69,0	67,1 ± 14,1
171	Ö[2)]	69,0	63,5 ± 10,1
162	Ö	69,0	55,6 ± 6,3
Versuch K 11			Mittelwert (± S; N = 2)
Standard		4,13	4,13 ± 0,04
111	G	4,13	4,83 ± 0,15
109	G	4,13	4,26 ± 0,04
94	Ö	4,13	4,40 ± 0,03
Versuch T 1			Mittelwert (± S; N = 2)
Standard		50,4	50,4 ± 9,1
32		50,4	47,2 ± 11,8
26		50,4	42,0 ± 7,4

1) Schnitte aus gesundem Gehirn

2) Schnitte aus ödematösem Gehirn; Kälteschädigung bei trepaniertem Schädel und intakter Dura mit Kohlensäureschnee-Aceton (nach KLATZO (14))

4.2. G-3-P-ERGEBNIS

Versuch T 7

Proben Nr.	Molarität mM	1. Ergebnis mM	2. Ergebnis mM	Mittelwert mM(±S;N=2)	G-3-P-Verbrauch pro mg Trs. in µg
Standard	9,14	9,14	9,14	9,14 ± 0	
10	1,83	0,84	0,84	0,84 ± 0	40
24	1,83	0,92	0,92	0,92 ± 0	33
52	4,57	2,88	2,86	2,87 ± 0,01	78
65	4,57	3,21	3,19	3,20 ± 0,01	73
145	9,14	5,50	5,40	5,45 ± 0,05	103
148	9,14	6,10	6,02	6,06 ± 0,04	138

4.2. G-3-P-ERGEBNIS

Versuch T 58

Proben Nr.	Molarität mM	1. Ergebnis mM	2. Ergebnis mM	Mittelwert mM(±S;N=2)	G-3-P-Verbrauch pro mg Trs. in µg
Standard	9,89	9,90	9,88	9,89 ± 0,01	
153	9,89	7,06	6,98	7,02 ± 0,04	132
158	9,89	6,56	6,54	6,55 ± 0,01	142
174	9,89	6,58	6,56	6,57 ± 0,01	125
202	9,89	6,98	7,10	7,04 ± 0,06	131

4.2. G-3-P-ERGEBNIS

Versuch T 59

Proben Nr.	Molarität mM	1. Ergebnis mM	2. Ergebnis mM	Mittelwert mM(±S;N=2)	G-3-P-Verbrauch pro mg Trs. in µg
Standard[1)]	5,24	5,24	5,24	5,24 ± 0	
145	10,48	6,66	6,66	6,66 ± 0	209
151	10,48	6,40	6,42	6,41 ± 0,01	185
190	5,24	4,70	4,70	4,70 ± 0	26
209	5,24	3,84	3,84	3,84 ± 0	53

1) Dieser Standard bestand aus einem Gemisch aus G-3-P und Fruktose-Diphosphat

4.2. G-3-P-ERGEBNIS

Versuch T 62

Proben Nr.	Molarität mM	1. Ergebnis mM	2. Ergebnis mM	Mittelwert mM(±S;N=2)	G-3-P-Verbrauch pro mg Trs. in µg
Standard	9,06	9,16	8,96	9,06 ± 0,10	
82	9,06	6,70	6,80	6,75 ± 0,05	96
161	9,06	6,60	6,62	6,61 ± 0,01	84
162	9,06	5,58	5,68	5,63 ± 0,05	105
195	9,06	6,52	6,62	6,57 ± 0,05	94

4.2. G-3-P-ERGEBNIS

Versuch T 63

Proben Nr.	Molarität mM	1. Ergebnis mM	2. Ergebnis mM	Mittelwert mM(±S;N=2)	G-3-P-Verbrauch pro mg Trs. in µg
Standard	40,72	39,68	41,76	40,72 ± 0,94	
Standard[1)]	42,32	41,52	43,12	42,32 ± 0,80	
184	40,72	33,52	32,64	33,08 ± 0,44	262
189	40,72	30,16	31,44	30,80 ± 0,64	386
210	42,32	35,28	34,08	34,68 ± 0,60	305
216	42,32	33,44	32,00	32,72 ± 0,72	364

1) Dieser Standard bestand aus einem Gemisch aus G-3-P und Fruktose-Diphosphat

4.2 G-3-P-ERGEBNIS

Versuch T 72

Proben Nr.	Molarität mM	1. Ergebnis mM	2. Ergebnis mM	Mittelwert mM(±S;N=2)	G-3-P-Verbrauch pro mg Trs. in ug
Standard	4,71	4,77	4,64	4,71 ± 0,07	
Standard[1)]	2,35	2,34	2,35	2,35 ± 0,01	
87	4,71	3,23	3,18	3,21 ± 0,03	64
117	4,71	3,08	3,16	3,12 ± 0,04	65
198	2,35	1,54	1,54	1,54 ± 0	34
215	2,35	1,48	1,46	1,47 ± 0,01	36

1) Dieser Standard bestand aus einem Gemisch aus G-3-P und Fruktose-Diphosphat

4.2 G-3-P-ERGEBNIS

Versuch T 81

Proben Nr.	Molarität mM	1. Ergebnis mM	2. Ergebnis mM	Mittelwert mM(±S;N=2)	G-3-P-Verbrauch pro mg Trs. in ug
Standard	9,10	9,16	9,04	9,10 ± 0,06	
Standard[1)]	9,15	9,14	9,16	9,15 ± 0,01	
43	9,10	5,96	5,94	5,95 ± 0,01	125
59	9,10	6,36	6,38	6,37 ± 0,01	95
144	9,15	6,42	6,50	6,46 ± 0,04	87
194	9,15	6,36	6,34	6,35 ± 0,01	79

1) Dieser Standard bestand aus einem Gemisch aus G-3-P und Fruktose-Diphosphat

4.3 GLYCERIN-DEHYDROGENASE-ERGEBNIS

Versuch K

Proben Nr.	Zusatz	Molarität mM	Ergebnis mU/mg Trs.
18	Kontrolle		0,03
29	Kontrolle		0,00
13	F-1.6-P_2	10	0,00
23	F-1.6-P_2	10	0,08

4.4. GLYCEROKINASE-ERGEBNIS

Versuch H 4

Probe Nr.		Zusatz	Konzentration µg/ml	Ergebnis mU/mg Trs.
80	G[1)]	Kontrolle		0,29
88	G	Kontrolle		0,12
118	G	Hydergin	30	0,00
119	G	Hydergin	30	0,00
98	Ö[2)]	Kontrolle		0,23
112	Ö	Kontrolle		0,11
120	Ö	Hydergin	30	0,35
125	Ö	Hydergin	30	0,33

1) Schnitte aus gesundem Gehirn.

2) Schnitte aus ödematösem Gehirn; Kälteschädigung bei trepaniertem Schädel und intakter Dura mit Kohlensäureschnee-Aceton (nach KLATZO (14)).

Bei dieser Versuchsreihe wurde ein Extinktionsstillstand des Gemisches vor Start erst nach ca. 2 Stunden erreicht.

4.4. GLYCEROKINASE-ERGEBNIS

Versuch N 3

Probe Nr.		Zusatz	Konzentration µg/ml	Ergebnis mU/mg Trs.
151	G[1]	Kontrolle		0,11
158	G	Kontrolle		0,00
59	G	Glukagon	5	0,05
67	G	Glukagon	5	0,11
94	Ö[2]	Kontrolle		0,17
143	Ö	Kontrolle		0,19
45	Ö	Glukagon	5	0,12
58	Ö	Glukagon	5	0,12

1) Schnitte aus gesundem Gehirn.

2) Schnitte aus ödematösem Gehirn; Kälteschädigung bei trepaniertem Schädel und intakter Dura mit Kohlensäureschnee-Aceton (nach KLATZO (14)).

Bei dieser Versuchsreihe wurde ein Extinktionsstillstand des Gemisches vor Start erst nach ca. 2 Stunden erreicht.

6-PHOSPHAT-DEHYDROGENASE-ERGEBNIS

Versuch A 13

Probe Nr.		Zusatz	Molarität mM	Ergebnis mU/mg Trs.
109	G[1]	Kontrolle		0,0
117	G	Kontrolle		0,3
104	G	F-1.6-P_2	10	0,0
105	G	F-1.6-P_2	10	0,4
106	Ö[2]	Kontrolle		0,0
108	Ö	Kontrolle		0,3
50	Ö	F-1.6-P_2	10	0,4
103	Ö	F-1.6-P_2	10	0,0

1) Schnitte aus gesundem Gehirn.

2) ödematösem Gehirn; Kälteschädigung bei trepaniertem Schädel und intakter Dura mit Kohlensäureschnee-Aceton (nach KLATZO (14)).

5. DISKUSSION

Die Glycerinbestimmungen wiesen in den höheren Konzentrationen der Versuche M 8 und T 1 deutlich auf einen Abbau von Glycerin in Gegenwart der Kaninchen-Hirnschnitte hin. Im Versuch K 11 dagegen war Glycerin nur in der Konzentration 4 mM zugegeben worden. Hier wurden innerhalb der Streuung der Messwerte nach den Inkubationen etwa die gleichen Konzentrationen gefunden wie vor den Inkubationen. Diese Ergebnisse sind in gewissem Einklang mit den Befunden von SLOVITER et al. (22), die eine Zunahme des oxydativen Glycerinabbaues durch Meerschweinchen-Hirnschnitte bei Steigerung der Glycerinkonzentration von 25 auf 200 mM fanden. Die Autoren bezogen dabei den Substratabbau auf das Gewicht der inkubierten Hirnsubstanz. Trotz der Schwankungen zwischen den einzelnen Versuchen und Reaktionsgefäßen beweisen also meine Messungen, daß auch Kaninchen-Hirnschnitte Glycerin als energielieferndes Substrat abbauen, wenn die Konzentrationen ausreichend hoch sind.

Eine Übertragung auf in vivo-Verhältnisse ist schon aus Gründen der Morphologie nicht ohne weiteres möglich; aber eine Umrechnung der Konzentrationen soll doch zur groben Orientierung durchgeführt werden: bei der, recht willkürlichen, Annahme einer Gleichverteilung von Glycerin im Organismus wird die Konzentration 50 mM bei Applikation von etwa 300 g Glycerin pro Erwachsenen erreicht. Diese Menge beträgt zwar etwa das 5 bis 10-fache der Konzentra-

tionen, die TOURTELLOTTE et al. (24) sowie TROBISCH (26) verwenden; bei der sehr guten Verträglichkeit von Glycerin ist aber die Verwendung sehr hoher Dosen durchaus möglich. Andererseits wurde von TOURTELLOTTE et al. (24) nachgewiesen, daß Plasma-Glycerinkonzentrationen von 10 mM durchaus erreichbar sind. Diese Messungen bestätigen die Richtigkeit meiner unter Annahme einer Gleichverteilung im Organismus durchgeführten Berechnung und lassen die Verwendung höherer Dosierungen von Glycerin nicht nur zur Entwässerung von Hirnödemen sondern auch zur Intensivierung des Hirnstoffwechsels sinnvoll erscheinen.

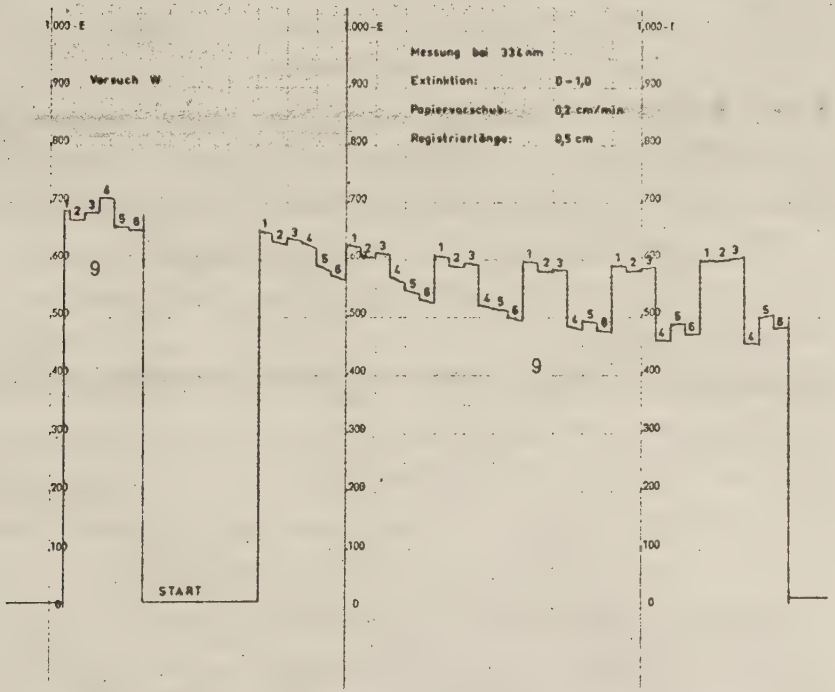
Die Glycerinaldehydbestimmungen waren in methodischer Hinsicht sehr unbefriedigend. Ausgehend von der unter 3.2 angegebenen Originalvorschrift von GOEDDE et al. (12) wurden viele experimentelle Veränderungen der Messtechnik vorgenommen. Es wurden aber selbst in Gegenwart hoher ADH-Konzentrationen mit enteiweißten und auch mit nicht enteiweißten Proben keine befriedigenden Reaktionsgeschwindigkeiten des Glycerinaldehyds erreicht. In den Reaktionsansätzen, wo probehalber eine große Menge reiner Glycerinaldehyd in die Küvetten gegeben wurde, wurden zwar hohe Anfangsgeschwindigkeiten der ADH-Reaktion mit Glycerinaldehyd erreicht; damit ist aber nicht erwiesen, daß bei diesem Verfahren die Substanz vollständig umsetzbar und damit quantitativ erfassbar ist. Weil mir keine andere brauchbare Methode zur Bestimmung von Glycerinaldehyd bekannt ist, wurde trotz der unbefriedigenden Methodik die Glycerinaldehydkonzentration in den Inkubationslösungen

aus dem manometrischen Versuch K 2 zu bestimmen versucht. Diese Messungen brachten erst nach 12-stündiger Messdauer einen Stillstand der Extinktionen in zeitlicher Hinsicht, wobei in den Kontrollen schon zu einen früheren Zeitpunkt eine langsame Trübung aufgetreten war. Somit besteht also die Möglichkeit, daß die eigentliche ADH-Reaktion zu diesem Zeitpunkt noch nicht zu Ende abgelaufen war, sondern daß sie durch die Trübung in den Küvetten nach der langen Inkubationsdauer überlagert wurde; dadurch wären auch die geringen wiedergefundenen Glycerinaldehyd-Konzentrationen zu erklären, die auf Seite 26 zusammengefaßt sind.

In der Annahme, daß sich der Glycerinaldehyd in den Proben aus dem Versuch K 2 möglicherweise durch zu lange Lagerung zersetzt haben könnte, wurde ein neuer Warburg-Versuch "W" durchgeführt, und ich habe die neuen K-Lösungen sofort aufgearbeitet.

In der ersten Serie von Messungen an den Proben aus diesem Warburg-Versuch wurde in Citrat-Puffer gearbeitet. Diese Messungen sind unter der Protokollnummer "W 1" zusammengefasst; sie brachten ebenfalls nach 2-stündiger Messdauer keinen Stillstand der Extinktionen in zeitlicher Hinsicht. Eine Auswertung der registrierten Extinktionsverläufe ergab die Glycerinaldehyd-Konzentrationen, die in der Tabelle Seite 31 zusammengefasst sind. Obwohl die Molaritäten im Warburg-Versuch 5 bzw. 1 mM waren, wurde mehr als das Doppelte gefunden. Unter "W 2" sind die Messungen zusammengefasst, die an den gleichen Proben nach der gleichen Messanordnung jedoch in einem TRA-Puffer vom pH: 7,4 durch-

geführt wurden. Die Extinktionsänderungen verliefen zwar in diesem Falle etwas schneller, aber selbst nach 8 Std. war noch kein Stillstand erreicht. Andererseits wurden bei rechnerischer Auswertung dieser Bestimmungen in den gleichen Proben fast doppelt so hohe Konzentrationen wie bei "W 1" gefunden. Sie betrugen damit angenähert das 4-fache der im Warburg-Versuch wirklich vorhanden gewesenden Konzentrationen von Glycerinaldehyd.



Aufzeichnung 6 verschiedener Proben in ihrem Reaktionsablauf bei der Glycerinaldehyd-Bestimmung; registriert mit einem Photometer-Schreiber. Nähere Erläuterungen im nachfolgenden Text.

Einen typischen Verlauf der Extinktions-Zeit-Kurven zeigt die vorstehende Abbildung. Man erkennt die sehr langsame Extinktionsänderung nach Start mit ADH. Außerdem ist deutlich ein Ansteigen der Kurven 1, 2 und 3 (Leerwerte) und dann auch der Kurven 5 und 6 (Proben) im späteren Teil der Messung sichtbar. Die Kurve 4 zeigt zwar gegen Ende keine Extinktionsänderung; möglicherweise ist diese scheinbare Extinktionskonstanz doch nur die Resultierende aus geringer Abnahme und Zunahme der Extinktion. (Eine Abnahme bedeutet Ablauf der ADH-Reaktion, eine Zunahme bedeutet Auftreten einer Trübung infolge langsamer Denaturierung von Eiweiß bei der langen Inkubationsdauer.)

Als Schlußfolgerung aus den langwierigen und aufwendigen, in ihrem Ergebnis aber enttäuschenden Messungen lässt sich folgendes sagen: Nur in Gegenwart hoher ADH-Konzentrationen wird Glycerinaldehyd mit messbarer Geschwindigkeit umgesetzt. Dies ist eine teilweise Bestätigung der Untersuchungen von GOEDDE et al. (12). Ich fand aber, daß die von GOEDDE vorgeschlagenen ADH-Konzentrationen weit überschritten werden müssen, um ausreichende Reaktionsgeschwindigkeiten zu erhalten. Andererseits werden mit den extrem hohen ADH-Mengen vermutlich auch solche Mengen anderer Enzyme als Verunreinigungen der ADH-Präparate in das Reaktionsgemisch gebracht, daß neben Glycerinaldehyd auch andere Substrate unter Verbrauch von NADH umgesetzt werden. Die von GOEDDE et al. (12) angegebene Methode mag deshalb für reine Lösungen von Glycerinaldehyd anwendbar sein, für die Bestimmung von Glycerinaldehyd in biologischen Lösungen ist sie unbrauchbar.

In älteren Versuchen mit Glycerinaldehyd hatte LITSCH (17) nachgewiesen, daß nach Einwirkung von mindestens 1 mM Glycerinaldehyd auf Kaninchen-Hirnschnitte in den Inkubationslösungen kein ATP-spaltendes Enzym nachweisbar ist. Es ergab sich die Frage, ob dies eine spezifische Wirkung von Glycerinaldehyd auf die Freisetzung von ATP-spaltendem Enzym aus Hirnschnitten ist. Es wäre denkbar, daß der sehr reaktionsfähige Aldehyd unspezifisch denaturierend auf Proteine wirkt. Deshalb wurden von mir in den Lösungen des Versuches "W" die Aktivitäten von LDH und MDH in Proben ohne und mit Zusatz von Glycerinaldehyd gemessen. In den "W 3" und "W 4 " beschrifteten Tabellen der Seiten 36 und 38 sind nicht die gefundenen Glycerinaldehydkonzentrationen eingetragen, sondern die tatsächlich im Verlauf des Warburg-Versuches hergestellten Konzentrationen von 1 mM bzw. 5 mM Glycerinaldehyd. Aus beiden Tabellen ist offensichtlich, daß die LDH- und auch die MDH-Aktivitäten in den Lösungen trotz anfänglicher Zugabe von 1 oder 5 mM Glycerinaldehyd unbeeinflußt hoch sind. Daraus wird gefolgert, daß Glycerinaldehyd nicht als unspezifisches Denaturierungsmittel wirkt, sondern spezifisch die Freisetzung von ATP-spaltendem Enzym hemmte.

Bei den Glycerat-3-phosphat-Bestimmungen wurden im Gegensatz zu den erwähnten Glycerinaldehyd-Bestimmungen befriedigende Ergebnisse erhalten: Die Übereinstimmung mehrfach durchgeführter Analysen der selben Proben war gut, wie die Tabellen unter 4.2 zeigen; die Extinktionsänderung während der Bestimmungen verlief hinreichend schnell; in

Standardlösungen mit bekanntem Glycerat-3-phosphat-Gehalt wurden angenähert die theoretischen Werte gefunden. In einigen Versuchen wurden zwar nur etwas über 90 Prozent der eingewägten Glycerat-3-phosphat-Menge wiedergefunden, außer Fehlern bei der Durchführung der Analysen kommen aber auch folgende Fehlerquellen in Betracht: Verunreinigungen in den benutzten Präparaten, Wägefehlern und Verluste beim Einkippen der Substanzen in den Hauptraum der Warburg-Gefäße.

Allgemein wurde bei allen untersuchten Proben ein Abbau von Glycerat-3-phosphat während der Inkubationen im Warburg-Versuch deutlich nachgewiesen. Die Frage nach dem Verbleib des metabolisierten Glycerat-3-phosphats liegt nahe. Der vollständige Abbau im Verlauf der Glykolyse-Kette würde zur Bildung von Lactat führen. Bei Messungen des Glukose-Verbrauches und der Lactat- sowie Pyruvat-Bildung ergab sich eine deutliche Steigerung nach dem Zusatz von Glycerat-3-phosphat in allen Versuchen. In der folgenden Tabelle wird die Frage untersucht, ob die gemessene Steigerung der Bildung von Lactat plus Pyruvat allein durch Zunahme des Glukose-Verbrauches der Hirnschnitte unter Zusatz von Glycerat-3-phosphat zu erklären ist. Der in der dritten Spalte dieser Tabelle angegebene Zahlenwert wurde für jeden Versuch durch Subtraktion der Glykolyse(Lactat + Pyruvat)-Steigerung von der Steigerung des Glukose-Verbrauches in Gegenwart von Glycerat-3-phosphat errechnet. (Ein Gramm Glukose bildet ein Gramm Milchsäure bzw. fast genau ein Gramm Brenztraubensäure). Aus der Tabelle ist

ersichtlich, daß bei der Hälfte der Versuche kleine positive Werte, bei der anderen Hälfte negative Werte resultieren. Einige niedrige Zahlenwerte dürften lediglich Messfehler darstellen. Das würde bedeuten, daß die berechnete Differenz etwa Null ist. Das heißt, die Steigerung der Glykolyse ist hier einfach mit einer Steigerung des Glukose-Verbrauches erklärbar. Eine größere negative Differenz, wie im Versuch T 58 mit 10 mM Glycerat-3-phosphat, läßt allerdings doch die Frage nach einer direkten Bildung von Milchsäure aus extra zugesetztem Glycerat-3-phosphat bestehen. Wegen der unvermeidbaren Streuungen der Messergebnisse soll diese Frage in einer Serie von Versuchen mit gleichen Inkubationsbedingungen geklärt werden.

Versuch Nr.	Glycerat-3-phosphat-Konzentration	Steigerung des Glukoseverbrauchs - Steigerung der Glykolyse
T 7	10 mM	1,7 µg/mg Trs.
	5 mM	- 3,2 µg/mg Trs.
	2 mM	0,6 µg/mg Trs.
T 58	10 mM	- 7,8 µg/mg Trs.
T 59	10 mM	- 2,6 µg/mg Trs.
T 62	10 mM	- 0,2 µg/mg Trs.
T 63	50 mM	4,9 µg/mg Trs.
T 72	5 mM	2,7 µg/mg Trs.

Rein quantitativ betrachtet ist auffällig, daß unabhängig von der Anfangskonzentration des Glycerat-3-phosphats in den einzelnen Versuchen annähernd konstant immer der gleiche Bruchteil Glycerat-3-phosphat im Laufe der Inkubationen verschwand. Die Zahlenwerte dieser Quotienten sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt. Dies deutet auf die Einstellung eines Gleichgewichtes zwischen Glycerat-3-phosphat und einem anderen Intermediärprodukt hin.

Versuch Nr.	Glycerat-3-phosphat-Konzentration	Anfangskonzentration/ Endkonzentration
T 7	10 mM	0,59 ± 0,04
T 58	10 mM	0,67 ± 0,01
T 59	10 mM	0,72 ± 0,07
T 62	10 mM	0,71 ± 0,03
T 63	50 mM	0,79 ± 0,02
T 72	5 mM	0,66 ± 0,01
T 81	10 mM	0,69 ± 0,01
		Mittel: 0,69

TRAUTMANN (25) hat in den Inkubationslösungen aus manometrischen Versuchen die Glykolyse-Enzyme Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase, 3-Phosphoglycerat-Kinase, 3-Phosphoglycerat-Mutase, Enolase und Pyruvat-Kinase in größeren Aktivitäten nachgewiesen. Es ist also möglich, daß sich Glycerat-2-phosphat, Phosphoenol-Pyruvat oder Pyruvat, in Gegenwart von ATP auch 1.3-Diphosphoglycerat, aus dem

3-Phosphoglycerat bilden. In späteren Versuchen zu den in meiner Arbeit aufgedeckten Problemen soll systematisch nachgeprüft werden, ob sich ein oder mehrere dieser Intermediärsubstanzen in größerer Menge in den Lösungsproben nachweisen lassen. Man muß allerdings mit der weiteren Metabolisierung dieser Substrate auf anderen Stoffwechselwegen rechnen. So ist es durchaus möglich, daß ein vorübergehender Anstau von Pyruvat auch zu einer Intensivierung der Atmung führt. Die Q_{O_2}-Werte der Hirnschnitte sind tatsächlich in Gegenwart von Glycerat-3-phosphat erhöht.

Die Unterscheidung zwischen Abbau des zugesetzten Glycerat-3-phosphats innerhalb oder außerhalb der Hirnschnitte ist schwierig und dürfte durch Arbeiten mit markierten Substanzen zu klären sein.
Unabhängig von der Frage des Verbleibs der verschwundenen Glycerat-3-phosphat-Mengen möchte ich doch folgende Vermutung äußern: Wenn Glycerat-3-phosphat bei nicht erhöhtem osmotischen Druck der Inkubationslösungen (Kompensation durch Verringern der NaCl-Konzentration in den Lösungen) die Wasseraufnahme der Hirnschnitte erniedrigt, so liegt dem sicher eine Verstärkung der Bildung von chemischer Energie in Form von ATP zugrunde.

Die Enzyme Glycerin-Dehydrogenase, Glycerokinase und Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase konnten in den Lösungen nur in sehr kleinen Aktivitäten nachgewiesen werden. Es hat den Anschein, daß sich die Werte in einigen Versuchen echt von Null unterscheiden; aber verglichen mit den Aktivitäten anderer Enzyme in Inkubationslösungen nach den Ver-

suchen (z.B. TRAUTMANN (25) und SCHÖNBERGER (20)) sind die Werte doch sehr niedrig. Dies läßt andererseits folgende positive Aussagen zu: Wenn, wie in meiner Arbeit nachgewiesen, höhere Konzentrationen von Glycerin von den Hirnschnitten abgebaut werden, dann muß dieser Abbau intrazellulär erfolgen, weil zwei Enzyme mit dem Substrat Glycerin in der Lösung fehlen (Glycerin-Dehydrogenase und Glycerokinase).

Wenn aber den Schnitten zugesetztes Fruktose-Diphosphat, das die Wasseraufnahme der Schnitte verringert und den Stoffwechsel verstärkt, zu einem großen Teil in Dihydroxyacetonphosphat gespalten wird (KLINGE (15)), so liegt auch Dihydroxyacetonphosphat noch nach den Versuchen unverändert in der Lösung vor. Es kann dort wegen des Fehlens von Glycerinphosphat-Dehydrogenase nicht weiter abgebaut werden.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Nach Warburg-Versuchen mit Kaninchen-Hirnschnitten wurden durch Analysen der Inkubationslösungen folgende Fragen untersucht:

Kann Glycerin im Stoffwechsel abgebaut werden?
Wird Glycerinaldehyd abgebaut?
Beeinflußt Glycerinaldehyd die Freisetzung von Lactat-Dehydrogenase und Malat-Dehydrogenase aus dem Gewebe?
Wird Glycerat-3-phosphat verstoffwechselt?
Sind in den Inkubationslösungen Glycerin-Dehydrogenase, Glycerokinase und Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase vorhanden?

Folgende Beobachtungen wurden gemacht:

Oberhalb einer Glycerinkonzentration von 50 mM findet ein Abbau durch die Hirnschnitte statt.
In den untersuchten Proben ist Glycerinaldehyd mit der Alkohol-Dehydrogenase-Methode nicht bestimmbar.
1 und 5 mM Glycerinaldehyd hat keinen Einfluß auf die Freisetzung von Lactat-Dehydrogenase und Malat-Dehydrogenase aus den Hirnschnitten in die Salzlösungen.
2 bis 50 mM Glycerat-3-phosphat wird in deutlichem Ausmaß während der Versuche abgebaut. Unabhängig von der angewandten Konzentration werden ziemlich konstant 69% der eingesetzten Menge wiedergefunden.
Glycerin-Dehydrogenase, Glycerokinase und Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase wurden in einigen Proben in Aktivitäten von maximal 0,4 mU pro mg Hirntrockensubstanz gemessen.

S C H R I F T T U M S V E R Z E I C H N I S

(1) ARDENNE, M. von, und REITNAUER, P.G.: Untersuchungen zur Applikation und Verträglichkeit, Therapie wirksamer Dosen von DL-Glycerinaldehyd. Theoretische und experimentelle Grundlagen der Krebs-Mehrschritt-Therapie. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, (1967): 34-46

(2) ARDENNE, M. von, und TÜMMLER, R.: Zur Messung der Konzentration von DL-Glycerinaldehyd im Blut bzw. Infucoll-Blut-Gemischen und zur Bestimmung der Krebstherapiewirkdosis aus solchen Wirkdosen. Theoretische und experimentelle Grundlagen der Krebs-Mehrschritt-Therapie. VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin, (1967): 24-33

(3) BATES, H.M., CRADDOCK, V.M. and SIMPSON, M.V.: The Incorporation of Valine-1-C into Cytochrome c by Rat Liver Mitochondria. J. of the American Chem. Society, 80, (1958): 1000

(4) BOEHRINGER, GmbH, Mannheim: Biochemical Katalog:
GDH: Ausgabe Juni 1967
GK : Ausgabe Juni 1967

(5) BOEHRINGER, GmbH, Mannheim: Biochemical-Test-Kombination:
Glycerin: 1. Aufl. 1970 (670)
MDH : 1. Aufl. 1970 (370)

(6) CZOK, R.: in H.U. Bergmeyer (Hrsg.): Methoden der enzymatischen Analyse, 2, (1970): 1389-1392

(7) DITTMANN, J.: Lactat-Dehydrogenase im Liquor cerebrospinalis von Kindern. Optimale Substrat- und Coenzym-Konzentrationen, Normalwerte. Dtsch. Z. Nervenheilk., 192, (1968): 310-316

(8) DITTMANN, J.: Zum Glukosestoffwechsel von Schnitten aus normalem und ödematösem Kaninchenhirn. (1972, in Vorbereitung)

(9) DITTMANN, J. and HERRMANN, H.-D.: Examination of the Metabolism of Oedematous Brain Tissue. III. The Influence of the Oxygen Concentration on the Respiration and the Aerobic Glycolysis of Normal and Oedematous Rabbit Brain in Vitro. Acta Neurochir., (1973; in press).

(10) DITTMANN, J., HERRMANN, H.-D. and OBERMANN, U.: Examination of the Metabolism of Oedematous Brain Tissue. II. The Influence of the Glucose Concentration on the Respiration and the Aerobic Glycolysis of Normal and Oedematous Rabbit Brain in Vitro. Acta Neurochir., (1972, in press).

(11) GEBICKE, H.-J.: Dissertation med. Fakultät Homburg/Saar, (1973).

(12) GOEDDE, H.W. und LANGENBECK, U.: in H.U. Bergmeyer (Hrsg.): Methoden der enzymatischen Analyse, 2, (1970): 1472-1474

(13) HERRMANN, H.-D. and DITTMANN, J.: Examination of the Metabolism of Oedematous Brain Tissue. I. Alterations of the Metabolism in the Coldoedema of the Rabbit-brain Measured Manometrically in Vitro. Acta Neurochir., 22, (1970): 167-175

(14) KLATZO, I., PIRAUX, A. and LASKOWSKI, E.J.: The Relationship between Edema, Blood Brain Barrier and Tissue Elements in a Local Brain Injury. J. Neuropath. Exp. Neurol. 17, (1958): 548-564

(15) KLINGE, J.: Dissertation med. Fakultät Homburg/Saar, (1973).

(16) LAGERKVIST, U.: Enzymic Synthesis of Xanthosine- and Guanosine-5-phosphate from Inosine-5-phosphate. Acta Chem. Scand., 9, (1955): 1028-1029

(17) LITSCH, J.Th.: Dissertation med. Fakultät Homburg/Saar, (1972).

(18) MENDEL, B.: Krebszelle und Glycerinaldehyd. Klin. Wochenschrift, 8, (1929): 169-170

(19) NEUBERG, C., SALVESEN, R.H. and OSTER, G.: Role of Phosphoglyceric Acid Salts in the Solubilization of Inorganic Substances in Nature. Arch. of Biochem. and Biophys., 95, (1961): 533-539

(20) SCHÖNBERGER, P.: Dissertation med. Fakultät Homburg/Saar, (1972)

(21) SEIFERT, H.J.: Dissertation med. Fakultät Homburg/Saar, (1972)

(22) SLOVITER, H.A., SHIMKIN, P. and SUHARA, K.: Glycerol as a Substrate for Brain Metabolism. Nature, 210, (1966): 1334-1336

(23) THYSON, M.: Dissertation med. Fakultät Homburg/Saar, (1973)

(24) TOURTELLOTTE, W.W., REINGLASS, J.L. and NEWKIRK, T.A.: Cerebral Dehydratation Action of Glycerol. I. Historical Aspects with Emphasis on the Toxicity and Intravenous Administration. Clinic. Pharm. and Therap., 13, (1972): 159-171

(25) TRAUTMANN, D.: Dissertation med. Fakultät Homburg/Saar, (1971)

(26) TROBISCH, U.: Behandlung des Hirndruckes mit oralen Glyceringaben. Kinderärztl. Praxis, 37, (1969): 271- 274

(27) VELLIS, J. DE, and INGLISH, D.: Hormonal Control of Glycerolphosphate Dehydrogenase in the Rat Brain. J. of Neurochem., 15, (1968): 1061-1070

(28) WARBURG, O.: Neue manometrische Zwei-Gefäß-Methode. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem., 348, (1967): 1677-1682

(29) WARBURG, O.: Wasserstoffübertragende Fermente. Verlag Dr. W. Saenger, Berlin 1948

(30) WARBURG, O., GAWEHN, K., GEISSLER, A.W. and LORENZ, S.: Über Heilung von Mäuse-Ascites-Krebs durch D- und L-Glycerinaldehyd. Z. klin. Chem., 1, (1963): 175-177

(31) WORTHINGTON, Biochemical Corp., Freehold, N.J.: Enzymes: Enzyme Reagents, 1968, Glycerol Dehydrogenase No.: 1.1.1.6

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ADH	= Alkohol-Dehydrogenase
ADP	= Adenosindiphosphat
ATP	= Adenosintriphosphat
DAP	= Dihydroxyacetonphosphat
F-1.6-P_2	= Fruktosediphosphat
GA	= Glycerinaldehyd
GAPDH	= Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
GDH	= Glycerin-3-phosphat-Dehydrogenase
GK	= Glycerokinase
GOT	= Glutamat-Oxalacetat-Transaminase
G-3-P	= Glycerat-3-phosphat
G-1.3-P_2	= 1.3-Diphosphoglycerat
LDH	= Lactat-Dehydrogenase
MDH	= Malat-Dehydrogenase
$MgSO_4$	= Magnesiumsulfat
NAD	= Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid
NADH	= Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid; reduziert
NADPH	= Nicotinamid-Adenin-Dinucleotidphosphat; red.
P_i	= anorganisches Phosphat
PEP	= Phosphoenolpyruvat
PGK	= Phosphoglyceratkinase
PK	= Pyruvatkinase
TIM	= Triosephosphat-Isomerase
TRA	= Triäthanolamin-Hydrochlorid
Trs.	= Trockensubstanz

L E B E N S L A U F

Am 31.10.1944 wurde ich, Joachim Waehlert, als Sohn des Arztes Dr. Gerhard Waehlert und dessen Ehefrau Beate, geb. Stadt, in Bad Homburg geboren.

Von 1951 bis 1955 besuchte ich die Volksschule in Oberursel im Taunus. Nach einjährigem Besuch der dortigen Realschule zogen meine Eltern nach Brombach/Ts. um, da mein Vater sich als praktischer Arzt niedergelassen hat. Durch diesen Wohnungswechsel ging ich von 1956 bis 1962 in Usingen/Ts. zuerst auf die Mittelschule und dann in die Aufbauschule. Ende Obertertia, die ich wiederholt hatte, zog ich nach Laubach/Oberhessen in ein evangelisches Alumnat, um dort an einem staatlichen humanistischen Gymnasium mein Abitur abzulegen.

Nach bestandener Reifeprüfung im Frühjahr 1966 schrieb ich mich zuerst in der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität des Saarlandes in Saarbrücken ein, da ich in der Medizinischen Fakultät keinen Studienplatz bekommen hatte. Nach einem Semester beantragte ich mit Erfolg den Wechsel in die Medizinische Fakultät; damit begann ich mein Medizinstudium im Herbst 1966.

Ostern 1968 bestand ich das Vorphysikum in Saarbrücken, im Frühjahr 1970 das Physikum in Homburg/Saar.

Im Sommer 1973 habe ich ebenfalls in Homburg/Saar das Staatsexamen abgelegt.

Herrn Professor Dr. med. F. LOEW, Direktor der Neurochirurgischen Klinik der Universität des Saarlandes, danke ich für die freundliche Überlassung des Themas zu der vorliegenden Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. rer. nat. J. DITTMANN, Neurochirurgische Universitäts-Klinik; seine Anregungen und seine jederzeit bereitwillige Hilfe waren bei der Ausarbeitung und Abfassung der vorliegenden Arbeit eine wertvolle Unterstützung.